

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
C07K 14/705

(11) 공개번호 10-2005-0041710
(43) 공개일자 2005년05월04일

(21) 출원번호 10-2003-0076967
(22) 출원일자 2003년10월31일

(71) 출원인 한국과학기술연구원
서울 성북구 하월곡2동 39-1
제일약품주식회사
서울 서초구 반포1동 745-5
(72) 발명자 양병석
서울특별시용산구이촌1동300-10전보아파트1202
박성대
서울특별시서초구잠원동잠원재미리아파트1-1006

(74) 대리인 박정원

심사청구: 있음

(54) 활성화된 키나아제 활성을 갖는 D R 2 단백질 및 그제조방법

요약

본 발명은 src 티로신 키나아제 활성을 이용하여 DDR2 단백질의 DDR2 키나아제 활성부위 중의 티로신을 인산화시키는 방법, 이러한 방법으로 티로신이 인산화되어 증가된 활성을 갖는 티로신 키나아제 활성부위를 포함하는 DDR2 단백질 및 상기 티로신이 인산화된 DDR2 단백질을 유발 질병에 대한 치료제 발명의 표적으로서의 용도에 관한 것이다. 상기 방법은 src 티로신 키나아제의 영향으로 티로신이 인산화된 DDR2 키나아제 활성부위를 포함하는 단백질은 DDR2 티로신 키나아제보다 활성으로 인하여 유발되는 질병의 치료제 발명 및 검색에 매우 유용하다.

대표도

도 5

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 정제된 글루타치온-S-전이효소(GST)-DDR2 키나아제 활성부위(DDR2KD)의 용할 단백질(GST-DDR2KD)의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 src 단백질을 특이적으로 인식하는 항체로 웨스턴 블라팅하여, 제조된 src 유전자를 발현하는 마루코 바이러스를 숙주세포에 감염시 src 단백질이 발현됨을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3a는 src에 의하여 DDR2 키나아제 활성부위 중의 티로신의 인산화가 유도됨을 확인한 결과를 나타낸 것으로, GST가 용합된 DDR2 키나아제 활성부위 단백질을 단독 발현 또는 숙주세포에서 src와 1:1의 비율로 동시 발현시킨 후, 각각에서 용합된 GST가 용합된 DDR2 키나아제 활성부위 단백질을 정제하고 PAGE 겔에 전기영동한 후, 인산화된 티로신을 특이적으로 인식하는 항체로 웨스턴 블라팅한 결과이다.

라인 1: GST-DDR2 단독 발현 후 정제된 단백질.

라인 2: src와 동시 발현 후 정제된 GST-DDR2 단백질.

도 3b는 src에 의하여 DDR2 키나아제 활성부위 중의 티로신이 인산화되는 발현, GST-DDR1, GST-Akt1, GST-CDK4를 사용했을 때는 티로신 인산화가 일어나지 않음 보여주는 것으로, 도 3a와 같은 방법으로 GST-DDR2, GST-DDR1, GST-Akt1 및 GST-CDK4에 대하여 실험한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 DDR2 키나아제 활성부위와 src를 각각 코딩하는 바쿠로바이러스를 숙주세포로 동시 감염시 DDR2를 코딩하는 바이러스와 src를 코딩하는 바이러스 배합비율에 따른 DDR2 단백질의 발현 양의 변화와 확인한 결과를 나타낸 것으로 DDR2 단백질 정제 후 루마진 분석하고, 인산화된 티로신을 특이적으로 인식하는 항체를 이용하여 웨스턴 블랏팅으로 각각의 DDR2 키나아제 활성부위의 티로신 인산화 정도를 확인한 결과이다.

도 5는 src와 DDR2 키나아제 동시발현에 의한 티로신 인산화에 의하여 변형된 DDR2 키나아제 활성부위와 티로신이 인산화되지 않은 DDR2 키나아제 활성부위의 키나아제 활성 차이를 나타낸 것으로, poly(D4Y)n을 기질로 사용하거나 DDR2 키나아제 자체의 자가인산화 활성을 측정하여 비교한 것이다.

라인 1: GST-DDR2 단독 발현 후 정제된 단백질.

라인 2: src와 동시 발현 후 정제된 GST-DDR2 단백질.

도 6는 DDR2 키나아제 활성부위 단백질을 단독 발현 또는 숙주세포에서 src의 1:1로 동시 발현시킨 후, 각각에서 얻어진 DDR2 키나아제 활성부위 단백질을 정제하여, src에 의한 티로신 인산화에 의하여 변형된 DDR2 키나아제 활성부위와 티로신이 인산화되지 않은 DDR2 키나아제 활성부위의 ATP 농도변화에 따른 티로신 키나아제 활성측정에 있어서의 Km과 Vmax의 변화를 보여주는 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 src의 티로신 키나아제 활성을 이용하여 DDR2 단백질의 DDR2 키나아제 활성부위 중의 티로신을 인산화시키는 방법, 이에 의하여 티로신이 인산화되어 증가된 효소 활성을 갖는 티로신 키나아제 활성부위를 포함하는 DDR2 단백질 및 이를 DDR2의 활성이 관여하는 질병에 대한 치료제 발명에 이용하는 용도에 관한 것이다.

외부의 자극을 세포가 인지하는 방법 중의 하나는 세포막에 있는 수용체인 티로신 키나아제(tyrosine kinase)를 통한 인 것이다. 수용체 티로신 키나아제는 세포 외부로 노출된 세포의 부분 세포 내부의 사이토솔에 노출된 세포내 부분 및 그 중간에 위치하여 원형질막을 통과하는 막단과 부분으로 구성되어 있다. 수용체의 세포의 부분은 특정 리간드가 결합하는 부분이며, 세포 내 부분은 리간드에 의해 활성화된 수용체의 활성 신호를 세포 내로 전달하는 기능을 수행한다. 티로신 키나아제 수용체는 세포 내로 노출된 C-말단 부위에 티로신 키나아제 활성을 가지는 도메인이 존재하며, 세포의 부분에 특정 리간드가 부착되면 수용체 단백질이 단일체에서 이중체로 변형되면서, 티로신 키나아제가 활성화되어, 이중체 상에서 서로의 C-말단에 있는 티로신을 인산화시키는데, 이러한 티로신의 인산화 과정은 세포 외의 자극에 대한 신호를 세포 내로 전달하는 가장 중요한 과정이 된다. 이와 같이 C-말단의 티로신이 인산화된 수용체는 세포 내로 신호를 만들어 내게 된다. 현재, 이러한 기작으로 세포의 자극을 세포 내로 전달하는 티로신 키나아제 활성을 갖는 수용체가 많이 알려져 있다. 대표적 인 것으로는 EGFR, PDGFR, IR, IGF1R, c-fms, VEGFR 등이 여기에 속한다.

DDR (Discoidin Domain Receptor) 티로신 키나아제 수용체류 단백질도 이러한 티로신 키나아제 활성을 갖는 수용체들 중 하나이다. DDR은 세포 외 부위가 미생물에서 발견되는 핵산에 부착하는 단백질인 디스코이딘 디스코이딘이 있는 용제에 의해 활성화된다. 인간을 포함하는 동물의 경우, DDR1 및 DDR2 형의 아미노산 서열상 서로 유사한 기인 단백질이 각각 서로 다른 유전자에 의해 코딩되어 존재하는 것으로 알려져 있다. 인간에 있어서, DDR 티로신 키나아제 유전자의 존재는 1990년대 초에 알려지면서, 상기 키나아제의 기능에 대한 연구는 1997년 여기에 부착하는 리간드가 콜라겐과 유사한 사실이 처음 밝혀지면서 주목을 끌기 시작하여 본격화되고 있다.

일반적으로 유전적 변형이나 환경적 영향으로 특정 티로신 키나아제 수용체가 과다하게 발현되거나, 구조적 변화로 해당 리간드-결합 부위와 관계없이 지속적인 활성 유지하거나, 해당 리간드의 과다 생성 등으로 그 활성 조절 기작이 손상되어 그 활성이 크게 증가되거나 또는 그 반대 경우로 활성이 감소하는 경우로 질병형상을 유발하는 경우가 많다. 가장 대표적 으로는 EGFR 또는 PDGFR 등과 같은 수용체의 과잉 활성이 암의 중요한 요인 중 하나라는 것이 밝혀져 있으며, VEGFR의 활성 증가는 암에 있어 및 약성제가 갖기 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 최근에 여러 제약 회사에서 EGFR 특이적 저해제 화합물이나 VEGFR 특이적 저해제 화합물을 개발하여 암환자 등의 여러 치료제로서의 임상 실험 중에 있다. 이들 EGFR 및 VEGFR 특이적 저해제는 모두 이들 수용체 단백질의 C-말단에 있는 키나아제 활성을 저해하는 화합물들이며, 특히 이들 키나아제 효소의 ATP 부위에 대해서 ATP와 경쟁적으로 부착함으로써 효소와 ATP의 결합을 방해하여 효소 활성을 저해한다. DDR2 키나아제 단백질의 이상인 난치성 인질암이 간 질환 및 류마티스 등과 연관이 있음이 증명되었다. 간 질환 중은 라이프 콜라겐과 단백질 합성이 과다하여 간 질환이 야기되는 질병이다. 최근 들어, 현재 간경화 증상 유발의 주원인으로 지목되는 간 조직내의 간 성상 세포가 활성화되는 과정에서 DDR2의 발현이 증가한다는 실험결과가 발표되었다. 이는 DDR2의 발현증가가 간 성상 세포의 활성화에 중요한 역할을 하며, 간 경화의 주요 발병 인자임이 의미하는 것이다. 또한, 간 경화로 인한 DDR2의 리간드인 콜라겐 단백질의 축적과 그로 인한 수용체 단백질 DDR2의 지속적인 활성화는 DDR2의 활성이 간 경화 유발의 촉진 인자임을 유의하게 설명한다.

콜라겐과 연관된 또 다른 질병으로서, 류마티즘을 들 수 있다. 류마티즘은 지속적으로 연골 부위의 면역 세포가 활성화되어 TNF- α 와 같은 사이토카인(cytokine)의 분비량이 증가하면서, 콜라겐 분해 효소인 MMP-1의 활성이 매우 증가하여 연골 조직이 크게 파괴되는 질병이다. MMP-1 단백질은 주로 발현하는 연골 조직내의 세포는 연골을 만들고 있는 활막에 존재하는 활막 섬유아세포(synovial fibroblast)이다. 일반적으로, 이러한 활막 섬유아세포는 정상적인 상황에서는 증식과 활성이 잘 통제되어 있지만, 최근 DDR2 단백질의 활성 증가에 의하여 MMP-1 유전자 발현이 증가함이 발표되어 있다. 류

마티스 환자의 얼굴 조직에서 추출한 활막 섬유아세포에서 DDR2의 단백질 발현이 관찰되었으며, 아울러 이러한 활막 섬유아세포에 여러 형태의 콜라겐을 처리하면, MMP-1 유전자의 프로모터 활성이 증가함이 관찰되었다. 이러한 사실은 DDR2의 활성 증가가 류마티즘 병변을 일으키는 주원인을 만든다고 볼 수 있다.

상기한 사실들을 근거로 하여, 특히적으로 DDR2 티로신 키나아제 활성을 저해하는 물질은 간 경화나 류마티즘의 치료제 등으로 유용하게 이용될 수 있다고 유추된다.

한편, Src 단백질은 레트로바이러스의 일종인 Rous sarcoma 바이러스의 온코진(oncogene)으로서 동경원 scr-유전자로 부 발현되며, 일반적으로, 세포 부식, 세포 이동, 증식 및 분화에 대한 작용을 하는 단백질로 알려져 있다.

본 발명에서는 간 경화, 류마티즘, 또는 동맥경화 및 병변 발전의 주요한 원인이 병변 부위의 섬유아세포의 비정상적 성장이며, 이러한 섬유아세포 계열 세포의 성장은 DDR2 단백질의 발현 및 활성화가 필요하다는 사실들로부터 DDR2 단백질의 티로신 키나아제 활성 억제제를 분자적 수준에서 연구하여, src 티로신 키나아제에 의해 DDR2 단백질의 키나아제 활성 부위가 티로신 인산화되어 변형된 DDR2 키나아제 활성 부위 단백질을 제조하였으며, 이와 같은 티로신 인산화로 인하여 DDR2의 티로신 키나아제 활성이 증가한다는 것을 밝혀내어, 이 티로신 인산화가 DDR2 티로신 키나아제 활성에 기능적으로 중요함을 증명하였다. 따라서, 이 방법에 의해 제조된 티로신 인산화된 DDR2 키나아제 활성 부위를 포함한 단백질은 간경화, 류마티즘, 동맥경화 등의 병변 전진에서 DDR2 키나아제 활성이 활성화 된다는 점에서 DDR2의 키나아제 활성 저해 화합물 발명을 통한 DDR2의 과잉활성으로 인한 질병의 치료 화합물을 검색 및 개발할 때 매우 유용하다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

상기한 바와 같이, 본 발명은 DDR2 단백질의 티로신 키나아제 활성부위에 있어서, 티로신의 인산화로 인하여 DDR2 티로신 키나아제 활성이 증가함을 증명하여, 티로신 인산화가 DDR2 티로신 키나아제 활성에 기능적으로 중요한 역할을 함을 밝힘으로써, DDR2 티로신 키나아제 파다 활성으로 인하여 유발되는 질병의 치료제 발명을 위한 효과적인 표적 단백질 및 그의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 src 단백질의 티로신 키나아제 활성에 의하여 티로신 키나아제 활성부위에 티로신 인산화가 유도되어 증가된 키나아제 활성을 갖는 DDR2 단백질의 티로신 인산화된 DDR2 단백질 유발 질병에 대한 치료제 발명에 있어서 표적물질로서서의 유도 및 src 단백질의 티로신 키나아제 활성을 이용하여 티로신 키나아제 활성부위에 티로신 인산화가 유도된 DDR2 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다.

상기 src 단백질에 의한 DDR2 단백질의 티로신 키나아제 활성부위에서의 티로신 인산화시키는 방법에는 특별한 제한이 없으며, 예컨대, 정제된 src 단백질과 DDR2 단백질을 통상적인 조건 하에서 혼합하여, DDR2 키나아제 활성부위 단백질을 공동세포와 같은 적절한 숙주세포에서 src 티로신 키나아제 단백질과 동시 발현시킴으로써 수행할 수 있다.

본 발명의 한 구체예에 있어서, DDR2 키나아제의 활성부위 중의 티로신을 인산화시키는 방법은 다음과 같은 단계를 포함한다:

DDR2 단백질의 키나아제 활성부위를 충분히 포함하는 아마노산 서열을 코딩하는 cDNA를 증폭시키고, 임의적으로, 발현된 DDR2 단백질을 정제물 용이하게 하기 위하여 글루타치온-S-전이효소 (glutathione-S-transferase, GST) 유전자 등을 사용하여 일반적으로 알려진 방법에서 src DDR2 유전자에 융합시키고, 이를 적절한 바이러스에 도입시켜, DDR2 단백질을 코딩하는 제조할 바이러스를 제조하는 단계;

src 단백질을 충분히 포함하는 아마노산 서열을 코딩하는 cDNA를 증폭시키고, 이를 적절한 바이러스에 도입시켜, src 티로신 키나아제를 코딩하는 제조할 바이러스를 제조하는 단계;

상기에서 얻어진 DDR2 단백질 코딩 제조할 바이러스와 src 단백질 코딩 제조할 바이러스를 적당한 비율로 숙주세포에 동시에 감염시키고 동시 발현시킴으로써, 동시 발현된 src 단백질과 티로신 키나아제 활성에 의하여 티로신의 인산화가 유도된 DDR2 단백질을 발현시키는 단계; 및

상기 티로신의 인산화가 유도된 DDR2 단백질을 정제하는 단계.

또한, 본 발명은 상기와 같은 방법으로 얻어진 티로신이 인산화되어 활성이 변형된 티로신 키나아제 활성부위를 포함하는 DDR2 단백질 및 그의 DDR2 단백질의 티로신 키나아제 활성부위 내의 티로신 인산화로 유발되는 질병에 대한 치료제 개발 시 철저 설계 화합물 검색, DDR2 티로신 키나아제 활성부위의 단백질 구조 분석 등의 치료제 개발 연구에 활용될 수 있는 용도를 제공한다. 본 발명에 따른 DDR2 키나아제의 티로신 인산화 방법에 의하여 티로신이 인산화된 DDR2 단백질은 이러한 DDR2 단백질 중 티로신 키나아제 활성부위의 티로신 인산화로 인한 티로신 키나아제 활성의 변형으로 유발되는 질병, 특히, DDR2 티로신 키나아제의 파다 활성으로 인한 섬유아세포 계열 세포 성장에 주요 원인이 되는 질병의 치료제 발명에 있어서 보다 효과적인 물질로 사용될 수 있다.

본 발명의 DDR2 단백질의 티로신 키나아제 활성부위 내 티로신 인산화 방법을 바람직한 구체예를 들어 상세히 설명하면 다음과 같다.

DDR2 단백질은 원형질막에 부착되는 단백질로서, 상기한 바와 같이, 세포의 부위(N-말단 부분)와 막통과 부위, 및 사이드홀에 노출되는 세포 내 부위(C-말단 부분)의 3 부분으로 구분된다. 인간의 DDR2 단백질(SEQ ID NO:1)의 경우, 아마노산 1번에서 399번까지는 주로 세포 외로 표출되는 부위이며, 그 다음 22개의 아마노산(ILGLGVVAIFLLAIIIVHW, SEQ

ID NO:2) 부위는 막 통과 부위를 주로 구성하고, 그 이후의 441번에서 855번까지의 C-말단 부위(SEQ ID NO:3)는 사이토솔에 노출된 티로신 키나아제 활성을 갖는 부위이다. 본 발명에서는, src 티로신 키나아제에 의한 DDR2 단백질의 티로신 키나아제 활성 부위에 대한 연구에 의하여, 사람의 DDR2 단백질을 코딩하는 cDNA를 DDR2 단백질의 티로신 키나아제 활성 부위를 포함하는 아미노산 41번부터 C-말단 공인 855번 아미노까지의 부위를 코딩하는 cDNA 절편을 PCR 증폭하고 이를 통상적인 방법에 의하여 적절한 바이러스 내로 도입시켜 예컨대, 적절한 발현벡터에 클로닝하고, 인어진 발현벡터를 적절한 바이러스에 도입, DDR2 단백질을 발현하는 재조합 바이러스를 제조한다.

바람직하게는, 발현된 DDR2 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, 상기 DDR2 단백질의 티로신 키나아제 활성 부위를 충분히 포함하는 cDNA 단편에 아미노산 테깅을 위한 적절한 유전자를 결합시켜 도입시킬 수 있다. 상기 아미노산 테깅에 사용되는 유전자로서 글루타치온-S-전이효소(GST) 유전자, 티오레독신(thioredoxin) 유전자, 히스틴딘 울리고제 등이 사용 가능하다. 상기 재조합 될 바이러스 및 발현벡터로서, 강력한 프로모터를 갖는 바쿠로바이러스(Baculovirus) 및 이와 발현벡터를 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 상기 DDR2 단백질의 티로신 키나아제 활성부위를 포함하는 DNA 절편을 글루타치온-S-전이효소 유전자의 C-말단 코딩부위(3'부위)에 연결시키고, 이를 바쿠로바이러스 발현 벡터 pBacPAK8 (Clontech, USA)에 통상적인 유전자 재조합 기술을 이용하여 클로닝하여, DDR2 티로신 키나아제 활성부위 단백질과 글루타치온-S-전이효소의 융합 단백질을 발현하는 재조합 바쿠로바이러스를 제조할 수 있다(CHLONTECH BacPAK11, Baculovirus Expression System User Manual, PT1260-1(PR95847), Published 12 May 1999. Catalog # K1601-1).

이 때 사용되는 DDR2 단백질은 인간 DDR2에 한정되지 아니하며, cDNA는 DDR2 티로신 키나아제 코딩 부위를 포함하는 범위 내에서 그것이 코딩하는 아미노산 수의 제한 없이 사용 가능하다. 또한, DDR2 유전자 단편을 글루타치온-S-전이효소(GST) 유전자에 융합시키는 것은 단지 발현된 DDR2 단백질의 정제를 용이하게 하기 위한 것에 불과한 본 발명에 있어서 이들 방법적 도구는 아미노산 테깅 후 용도에 따라 융합된 형태로 사용하거나 또는 GST 부위를 적당한 프로테아제를 이용하여 제거 한 후 사용할 수 있다.

한편, 본 발명에 있어서, DDR2 티로신 키나아제 활성 부위에서의 티로신 인산화 반응을 위하여, src 티로신 키나아제를 코딩하는 정상 유전자 (SEQ ID NO: 4)를 PCR 증폭한 후, 이를 적절한 발현벡터에 클로닝시키고, 적절한 바이러스 내로 도입시켜, src 티로신 키나아제를 코딩하는 재조합 바이러스를 제조한다. 상기한 바와 같이, 재조합 될 바이러스로서 바쿠로바이러스를 사용할 수 있다.

상기에서 얻어진 DDR2 키나아제 활성부위 또는 DDR2 키나아제 활성부위와 글루타치온-S-전이효소의 융합 단백질을 코딩하는 재조합 바이러스 및 src 키나아제를 코딩하는 재조합 바이러스를 적절한 숙주세포로 적당한 비율로 동시 감염시키고 이들을 동시에 발현시키면, 발현된 src 단백질의 티로신 인산화 활성에 의하여 DDR2 키나아제 활성부위의 티로신 인산화되어, 티로신 인산화와 유도된 DDR2 키나아제를 얻을 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 바쿠로바이러스를 사용하는 재조합 바이러스를 제조하는 경우, 상기 숙주세포로서 바쿠로바이러스에 의한 DDR2 키나아제 활성부위와 글루타치온-sf9 (Clontech, USA)를 사용할 수 있다. 또한, DDR2 키나아제 활성부위 또는 DDR2 키나아제 활성부위와 글루타치온-S-전이효소의 융합 단백질을 코딩하는 재조합 바이러스 및 src 키나아제를 코딩하는 재조합 바이러스의 동시 감염시 src 키나아제 코딩 단백질의 비율이 높아지면, 발현되는 src 단백질의 양이 증가하여 인산화 효율이 높아지는 반면, DDR2 키나아제 활성부위 코딩 단백질의 비율이 감소하여 발현되는 DDR2 단백질의 양이 감소하여 낮아지는 DDR2 단백질 양이 줄어들게 된다. 이와 같은 점을 감안하여 볼 때, DDR2 키나아제 활성부위 또는 DDR2 키나아제 활성부위와 글루타치온-S-전이효소의 융합 단백질을 코딩하는 재조합 바이러스 및 src 키나아제를 코딩하는 재조합 바이러스의 배합 비율은 개체수 19:1 내지 1:19 (DDR2 키나아제 활성부위 또는 DDR2 키나아제 활성부위와 글루타치온-S-전이효소의 융합 단백질) 코딩 재조합 바이러스의 개체수 : src 키나아제 코딩 재조합 바이러스의 개체수) 범위로 하는 것이 바람직하다.

상기에서 얻어진 글루타치온-S-전이효소와 융합된 티로신 인산화가 유도된 DDR2 키나아제는 글루타치온이 부착된 비드를 이용한 통상적인 방법에 의한 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)에 의하여 순수 정제한다.

본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 숙주세포에서의 글루타치온-S-전이효소와 DDR2 키나아제 활성부위와 융합 단백질 및 src 티로신 키나아제의 발현은 이들을 각각 코딩하는 두 종류의 재조합 바쿠로바이러스를 적당한 비율로 배합하여 sf9 곤충세포로 동시 감염시키고, MOI (multiplicity of infection) 1 내지 10 사이에서 처리한 후, 24 내지 72시간 동안 유지하여 수확할 수 있다. 상기한 바와 같이, 곤충세포에서 src 단백질과 GST-DDR2 융합 단백질을 동시 발현한 후, 세포를 분석하고 분석을 위한 방법으로 글루타치온 아가로소 친화성 결합 크로마토그래피를 시행하여 글루타치온-S-전이효소와 DDR2 티로신 키나아제 활성부위 융합 단백질을 정제할 수 있다.

도 1은 글루타치온-S-전이효소-DDR2 티로신 키나아제 활성부위 융합 단백질을 글루타치온 아가로소 비드 결합 크로마토그래피를 통하여 정제하고, 10% 폴리아크릴 아마이드 겔에서 전기 영동한 후, 쿠마지 염색 시약을 이용한 결과를 나타낸 것이다. 도 1에서 알 수 있는 바와 같이 정제된 단백질은 예상된 분자량인 75,000 Da의 분자량을 보인다.

DDR2 티로신 키나아제 활성부위와 src의 동시 발현에 의한 영향을 알아보기 위한 대조 실험을 위하여, 상기한 바와 동일한 방법에 의하여 글루타치온-S-전이효소와 DDR2 티로신 키나아제 활성부위 융합 단백질을 발현시킨다. src 단백질은 특이적으로 인식하는 항체를 이용한 웨스턴 블랅팅에 의하여, 본 실험에서 사용한 src 단백질을 코딩 재조합 바쿠로바이러스가 src 단백질을 발현함을 확인할 수 있으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 본 발명의 구체예에서는 인간 c-src 유전자를 사용하였지만, 다른 종의 src 유전자 또는 변형된 v-src 유전자를 사용하여도 동일한 결과를 얻을 수 있다.

본 발명에서 흥미로운 결과로서, 도 3a에서 알 수 있는 바와 같이 인산화된 티로신을 특이적으로 인식하는 항체를 이용한 웨스턴 블랅팅 실험에 의하여, GST-DDR2 티로신 키나아제 활성부위 융합 단백질과 src 티로신 키나아제를 동시 발현시킨 것으로서, 상기 융합 단백질의 티로신이 인산화되어 변형됨을 확인하였다. 도 3a는 p-티로신 특이적 항체를 이용한 웨스턴 블랅팅 실험에 의하여, 도 3b에서 알 수 있는 바와 같이 정제된 단백질을 분석한 결과, 예상된 분자량인 75,000 Da의 분자량을 보인다.

턴 불포화 결합을 사용하여, 글루타치온-S-전이효소와 DDR2 티로신 키나아제 활성부위와의 융합 단백질들을 끈줄 세포에서 발현시킬 때, src 티로신 키나아제와 동시발현 여부에 따라 DDR2 티로신 키나아제 활성부위의 티로신 인산화의 유도 여부가 달라짐을 보여준다.

이 때, src와 동시 발현된 유 정제된 글루타치온-S-전이효소와 DDR2 키나아제 활성부위의 융합 단백질과 달리, 대조군으로 사용된 DDR1, CDK4 및 CDK1 키나아제와 GST와의 융합 단백질들은 src 티로신 키나아제와의 동시 발현시 티로신 인산화는 나타나지 않았으며, 이러한 결과를 도 3b에 나타내었다. 도 3b에서 알 수 있는 바와 같이, src 티로신 키나아제와의 동시 발현에 의한 티로신 인산화는 DDR2 키나아제 활성부위에서 특이적으로 일어남을 증명하는 것이라고 할 수 있다.

상기한 실험방법에 있어서, DDR2 단백질을 코딩하는 바쿠로바이러스와 src 단백질을 코딩하는 바쿠로바이러스를 숙주 세포에 감염 시, 그 비율을 변화시키면서 동시 감염시켰을 때, src 발현 바이러스의 비율이 높을수록 유도된 DDR2 티로신 키나아제에 대한 티로신 인산화 정도가 높아짐을 알 수 있는데, 이는 src 단백질에 의한 DDR2 키나아제에 대한 티로신 인산화 유도가 src 단백질 농도에 의존함을 보여주는 것이다. 도 4는 DDR2 키나아제 코딩 바이러스와 src 단백질 코딩 바이러스의 비율을 변화시키면서 동시 감염시킨 후, 발현된 DDR2 키나아제 활성부위를 정량적으로 정제하고 인산화된 티로신을 특이적으로 인식하는 항체를 사용하여 웨스턴 블랏팅한 결과를 보여주는 것이다. 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, DDR2 키나아제 코딩 바이러스와 src 단백질 코딩 바이러스가 19:1의 비율로 동시 발현되는 경우에도 DDR2 키나아제의 티로신 인산화 가 유의성있게 유도되었다.

본 발명에 따른 src 티로신 키나아제와의 동시발현에 의하여 티로신이 인산화된 DDR2 티로신 키나아제 단백질과 티로신이 인산화되지 않은 DDR2 티로신 키나아제 간의 기능상의 차이점을 밝히기 위하여, 인산화된 DDR2 티로신 키나아제와 인산화되지 않은 DDR2 티로신 키나아제의 효소 활성을 측정 및 비교하여 도 5에 나타내었다. 도 5는 src 티로신 키나아제와의 동시 발현에 의하여 티로신 인산화 가 유도된 DDR2 티로신 키나아제 활성부위 단백질의 키나아제 효소 활성과 및 단독 발현 후 측정되어 티로신이 인산화되지 않은 DDR2 티로신 키나아제 활성부위 단백질의 키나아제 효소 활성을 측정하여 예시한 것이다. 통상적인 티로신 키나아제 효소 활성 측정 방법에 사용되던 바이오민이 부화된 poly(D4Y) 기질 (Promega, U.S.A.)을 이용하여 통상적인 방법 (Promega 2001년 카탈로그 15.18 참조)에 의하여 티로신 효소 활성을 측정하여 비교한 결과, 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, 티로신 인산화된 DDR2 키나아제에 인산화되지 않은 대조 단백질에 비하여 키나아제 활성이 3 내지 10배 정도 증가한 것으로 나타났다. DDR2 키나아제 활성부위를 이용한 자가 인산화와 활성 측정에서도 인산화된 DDR2 키나아제의 자가 인산화 활성이 3 내지 10 배 정도 증가하는 것을 확인하였다.

이러한 활성 증가의 본질적 원인을 알아보는 하나의 수단으로 키나아제 효소의 기질 중 하나인 ATP에 대한 Km 값의 변화를 측정하였다. 이를 위하여, ATP의 농도 변화에 따른 반응속도의 변화를 측정한 후, 통상적인 효소의 기질에 대한 Km 값 측정하기 위하여 사용되는 리시프로그래프 방법 (Linbert Stryer, 생화학의 4 개판, 서울의과학사, pp. 202-205)을 이용하여 Km 값을 비교하였다. Km 값의 변화가 측정하여 도 6에 나타내었다. 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, src 단백질에 의하여 티로신이 인산화된 DDR2 키나아제 단백질의 ATP에 대한 Km 값이 티로신이 인산화되지 않은 대조 단백질과 비교하여 감소되었다. 따라서, 티로신이 인산화된 DDR2 키나아제 활성부위 단백질의 티로신이 인산화되지 않은 DDR2 키나아제 활성부위 단백질에 비교하여 증가된 효소 활성은 기질인 ATP에 대한 결합력의 증가에 기인함을 확인할 수 있다.

상기한 바로부터, DDR2 단백질을 표적으로 하여 저해 화합물을 발굴하여 치료제로서 개발함에 있어서, 통상적으로 ATP 경쟁적 기전에 의한 저해 기전을 가지는 화합물들 대상을 찾는 경우, 상기한 티로신이 인산화된 DDR2 단백질을 인산화되지 않은 대조군 DDR2 단백질을 본질적으로 구별되는 새로운 표적임을 알 수 있다. 이는 최근의 프로틴을 연구를 통한 신약 표적 발굴 연구동향에서 표적 단백질의 발현 후 변형에 따른 새로운 변형 표적 표적 단백질을 통한 연구의 전형적인 사례로 꼽힐 수 있다.

단백질은 mRNA로부터 발현된 후, 여러 형태의 화학적 변형을 거치게 된다. 이러한 화학적 변형의 형태로써 당기 지환, 인산화, 프로티아제에 의한 절단 등 다양한 변형이 있다. 이러한 변형의 형태는 세포가 처해있는 환경에 따라 달라질 수 있으며, 이러한 형태의 화학적 변형은 단백질의 활성을 나타내거나, 단백질의 발현을 조절하는 등 여러 가지 화학적 변형의 대표적인 예로 인산화를 들 수 있으며, 특히 세포 신호 전달 체계에서 중심적인 역할을 하는 단백질 키나아제의 경우에는 인산화에 의해서 그 활성이 크게 영향을 받는다.

많은 단백질은 절점상에서 그 활성이 변하며, 이와 같이 변형된 단백질은 치료제 개발의 표적이 되고 있다. 표적으로 이루어진 단백질의 경우, 단백질의 변형은 단백질에 부착되는 저분자 화합물의 부착 방식에 변화를 초래하는 것일 수 있다. 이러한 이유로 비특이적 유전적 변형은 단백질인 지라도 발현 후의 화학적 변형 변화에 따라 여러 가지의 상이한 표적 단백질이 될 수 있다는 것이 최근의 프로테오믹스 연구의 중요한 결론이다. 이런 점으로 미루어 볼 때, 티로신 인산화된 DDR2 단백질을 티로신이 인산화되지 않은 DDR2 단백질을 차별화 된 치료제 표적으로 유망성이 있다고 할 수 있다.

또한, DDR2 키나아제의 경우에 있어서, 일반적으로 키나아제 저해제 개발 시의 주요한 표적 도입인 ATP 부하 구조가 src 티로신 키나아제의 영향에 의한 인산화에 의하여 그 성질이 변한다는 상기의 실험적 사실은 본 발명에서 제시된 티로신이 인산화된 DDR2 키나아제 단백질이 비정상적 DDR2 키나아제 활성으로 인하여 야기되는 질병에 대한 새로운 표적 단백질이 될 수 있음을 보여 준다.

다음의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하겠으나, 본 발명이 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

곤추세르에서의 DDR2 키나아제 활성부위 및 src 단백질의 발현 및 정제

사람의 DDR2 유전자 중 아미노산 441 에서 855 부분을 코딩하는 c-말단 부분을 인간 DDR2 전장 DNA를 주형 (template)으로 하여 5' 프라이머 (ccc gga tcc atg aca gtc agc ctt tcc ct, SEQ ID NO: 5)와 3' 프라이머 (egg tct aga

DDR2 키나아제 활성 단백질의 ATP에 대한 Km 값의 결정을 위하여, 상기된 방법에 근거한 효소 반응속도 측정법에 의하여 ATP 농도를 10 μ M에서 0.3 μ M 까지 변화시키면서 본 발명에 따른 티로신이 인산화된 DDR2 단백질을 대조군의 티로신이 인산화되지 않은 DDR2 단백질에 의한 반응속도의 변화를 측정하였다. 각 ATP 농도의 역수에 대해 반응 속도의 역수 값을 프롯팅 한 후 얻어진 선형 그래프에서 X축 절편값의 역수를 취하여 Km 값을 결정하였다. 그 결과물 도 6에 나타내었으나 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 src에 의하여 티로신이 인산화된 DDR2 단백질의 ATP에 대한 Km 값이 티로신이 인산화되지 않은 대조군 단백질에 비하여 감소했다.

발명의 효과

본 발명은 DDR2의 키나아제 활성이 증가된 단백질을 제조하는 방법과 이를 통해 키나아제 활성이 증가된 DDR2 키나아제 활성 부위 단백질을 발명함으로써 DDR2 티로신 키나아제 과다 활성으로 인한 질병, 특히 간경화, 동맥경화 및 류마티스 관절염과 섬유아세포 계열 세포 성장에 주 원인인 질병의 신약 개발에 있어서 치료제 발굴 및 검색에 매우 유용한 표적 단백질을 제공할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

src 단백질의 티로신 키나아제 활성에 의하여 티로신 인산화가 유도된 DDR2 티로신 키나아제 활성부위를 포함하는 DDR2 단백질을 포함하는, 티로신이 인산화되어 티로신 키나아제 활성이 변형된 DDR2 단백질 유발 질병 치료제 발굴을 위한 표적물질.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 src 단백질을 위한 DDR2 티로신 키나아제 활성부위의 티로신 인산화가 DDR2 키나아제 활성부위를 충분히 포함하는 아미노산 서열 코딩 유전자에 도입된 제조할 바이러스와 src 단백질 코딩 유전자가 도입된 제조할 바이러스를 숙주세포에서 동시 발현시킴으로써 유도된 것인 표적물질.

청구항 3.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 질병이 간경화, 동맥경화 또는 류마티즘인 표적물질.

청구항 4.

DDR2 단백질의 키나아제 활성부위를 충분히 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 cDNA를 증폭시키고, 이를 바이러스에 도입시켜, DDR2 단백질을 코딩하는 제조할 바이러스를 제조하는 단계;

src 단백질을 충분히 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 cDNA를 증폭시키고, 이를 바이러스에 도입시켜, src 단백질을 코딩하는 제조할 바이러스를 제조하는 단계;

상기에서 얻어진 DDR2 단백질 코딩 제조할 바이러스와 src 단백질 코딩 제조할 바이러스를 숙주세포에 동시 감염시키고 동시 발현시켜, 동시 발현된 src 단백질의 티로신 키나아제 활성에 의하여 티로신 인산화가 유도된 DDR2 단백질을 발현시키는 단계; 및

상기 티로신의 인산화가 유도된 DDR2 단백질을 정제하는 단계를 포함하는,

티로신 인산화가 유도된 키나아제 활성부위를 포함하는 DDR2 단백질 제조방법.

청구항 5.

제 4 항에 있어서, 상기 DDR2 단백질 코딩 제조할 바이러스의 제조단계에서, DDR2 단백질의 키나아제 활성부위를 충분히 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 cDNA에 에피타입 태그를 위한 글루타미온-S-전이효소 유전자를 결합시켜 바이러스에 도입시켜, DDR2 단백질과 글루타미온-S-전이효소를 코딩하는 제조할 바이러스를 제조하여, DDR2 단백질을 글루타미온-S-전이효소와의 융합 단백질 형태로 발현시킴으로써, 발현되는 DDR2 단백질의 정제를 용이하게 하는 방법.

청구항 6.

제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 상기 제조할 될 바이러스가 바큐로바이러스이고, 상기 숙주세포가 곤충세포인 방법.

청구항 7.

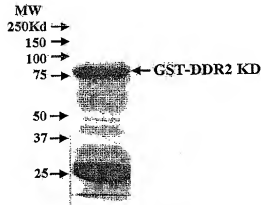
제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 상기 DDR2 단백질의 티로신 키나아제 활성 부위를 충분히 포함하는 cDNA가 사람의 DDR2 단백질을 코딩하는 cDNA중 아미노산 441 내지 855까지의 부위를 코딩하는 DNA 부분을 포함하는 방법.

청구항 8.

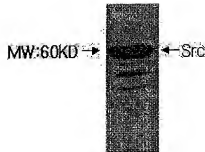
제 5 항에 있어서, 상기 얻어진 글루타치온-S-전이효소와 DDR2 단백질의 융합 단백질을 글루타치온이 부착된 비드를 이용한 글루타치온 아가로스 친화성 컬럼 크로마토그래피에 의하여 정제하는 방법.

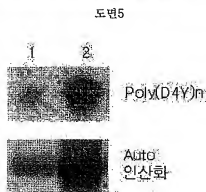
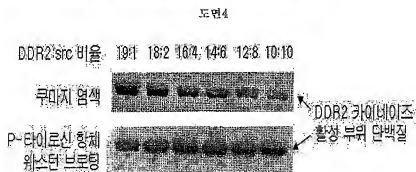
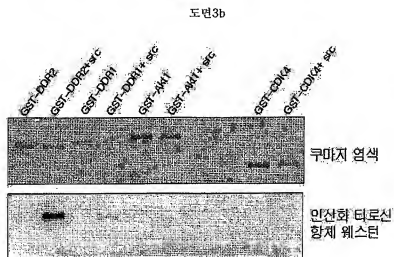
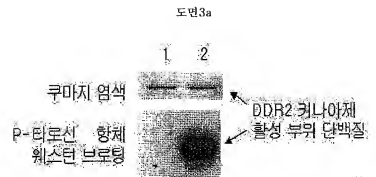
도면

도면1

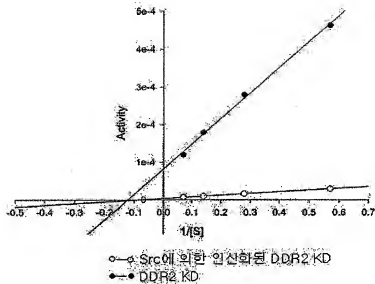


도면2





도면6



<110> KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
 <120> DDR2 PROTEIN WITH ACTIVATED KINASE ACTIVITY AND PREPARATION
 METHOD THEREOF
 <160> 8
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 855
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> amino acid sequence for human DDR2 protein
 <400> 1
 Met Ile Leu Ile Pro Arg Met Leu Leu Val Leu Phe Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 Ile Leu Ser Ser Ala Lys Ala Gln Val Asn Pro Ala Ile Cys Arg Tyr
 20 25 30
 Pro Leu Gly Met Ser Gly Gly Gln Ile Pro Asp Glu Asp Ile Thr Ala
 35 40 45
 Ser Ser Gln Trp Ser Glu Ser Thr Ala Ala Lys Tyr Gly Arg Leu Asp
 50 55 60
 Ser Glu Glu Gly Asp Gly Ala Trp Cys Pro Glu Ile Pro Val Glu Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Leu Lys Glu Phe Leu Gln Ile Asp Leu His Thr Leu His Phe
 85 90 95
 Ile Thr Leu Val Gly Thr Gln Gly Arg His Ala Gly Gly His Gly Ile
 100 105 110
 Glu Phe Ala Pro Met Tyr Lys Ile Asn Tyr Ser Arg Asp Gly Thr Arg
 115 120 125
 Trp Ile Ser Trp Arg Asn Arg His Gly Lys Gln Val Leu Asp Gly Asn
 130 135 140
 Ser Asn Pro Tyr Asp Ile Phe Leu Lys Asp Leu Glu Pro Pro Ile Val
 145 150 155 160
 Ala Arg Phe Val Arg Phe Ile Pro Val Thr Asp His Ser Met Asn Val

	165		170		175
Cys Met Arg Val Glu Leu Tyr Gly Cys Val Trp Leu Asp Gly Leu Val					
	180		185		190
Ser Tyr Asn Ala Pro Ala Gly Gln Phe Val Leu Pro Gly Gly Ser					
	195		200		205
Ile Ile Tyr Leu Asn Asp Ser Val Tyr Asp Gly Ala Val Gly Tyr Ser					
	210		215		220
Met Thr Glu Gly Leu Gly Gln Leu Thr Asp Gly Val Ser Gly Leu Asp					
	225		230		235
Asp Phe Thr Gln Thr His Glu Tyr His Val Trp Pro Gly Tyr Asp Tyr					
	240		245		250
Val Gly Trp Arg Asn Glu Ser Ala Thr Asn Gly Tyr Ile Glu Ile Met					
	255		260		265
Phe Glu Phe Asp Arg Ile Arg Asn Phe Thr Thr Met Lys Val His Cys					
	270		275		280
Asn Asn Met Phe Ala Lys Gly Val Lys Ile Phe Lys Glu Val Gln Cys					
	285		290		295
Tyr Phe Arg Ser Glu Ala Ser Glu Trp Glu Pro Asn Ala Ile Ser Phe					
	300		305		310
Pro Leu Val Leu Asp Asp Val Asn Pro Ser Ala Arg Phe Val Thr Val					
	315		320		325
Pro Leu His His Arg Met Ala Ser Ala Ile Lys Cys Gln Tyr His Phe					
	330		335		340
Ala Asp Thr Trp Met Met Phe Ser Glu Ile Thr Phe Gln Ser Asp Ala					
	345		350		355
Ala Met Tyr Asn Asn Ser Glu Ala Leu Pro Thr Ser Pro Met Ala Pro					
	360		365		370
Thr Thr Tyr Asp Pro Met Leu Lys Val Asp Asp Ser Asn Thr Arg Ile					
	375		380		385
Leu Ile Gly Cys Leu Val Ala Ile Ile Phe Ile Leu Leu Ala Ile Ile					
	390		395		400
Val Ile Ile Leu Trp Arg Gln Phe Trp Gln Lys Met Leu Glu Lys Ala					
	405		410		415
Ser Arg Arg Met Leu Asp Asp Glu Met Thr Val Ser Leu Ser Leu Pro					
	420		425		430
Ser Asp Ser Ser Met Phe Asn Asn Asn Arg Ser Ser Ser Pro Ser Glu					
	435		440		445
Gln Gly Ser Asn Ser Thr Tyr Asp Arg Ile Phe Pro Leu Arg Pro Asp					
	450		455		460
Tyr Gln Glu Pro Ser Arg Leu Ile Arg Lys Leu Pro Glu Phe Ala Pro					
	465		470		475
Gly Glu Glu Glu Ser Gly Cys Ser Gly Val Val Lys Pro Val Gln Pro					
	480		485		490
Ser Gly Pro Glu Gly Val Pro His Tyr Ala Glu Ala Asp Ile Val Asn					
	495		500		505
Leu Gln Gly Val Thr Gly Gly Asn Thr Tyr Ser Val Pro Ala Val Thr					
	510		515		520
Met Asp Leu Leu Ser Gly Lys Asp Val Ala Val Glu Glu Phe Pro Arg					
	525		530		535
Lys Leu Leu Thr Phe Lys Glu Lys Leu Gly Glu Gly Gln Phe Gly Glu					
	540		545		550
Val His Leu Cys Glu Val Glu Gly Met Glu Lys Phe Lys Asp Lys Asp					
	555		560		565
Phe Ala Leu Asp Val Ser Ala Asn Gln Pro Val Leu Val Ala Val Lys					
	570		575		580
Met Leu Arg Ala Asp Ala Asn Lys Asn Ala Arg Asn Asp Phe Leu Lys					
	585		590		595
Glu Ile Lys Ile Met Ser Arg Leu Lys Asp Pro Asn Ile Ile His Leu					
	600		605		610
	615		620		

```

625          630          635          640
Leu Ser Val Cys Ile Thr Asp Asp Pro Leu Cys Met Ile Thr Glu Tyr
        645          650          655
Met Glu Asn Gly Asp Leu Asn Gln Phe Leu Ser Arg His Glu Pro Pro
        660          665          670
Asn Ser Ser Ser Ser Asp Val Arg Thr Val Ser Tyr Thr Asn Leu Lys
        675          680          685
Phe Met Ala Thr Gln Ile Ala Ser Gly Met Lys Tyr Leu Ser Ser Leu
        690          695          700
Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Lys
        705          710          715          720
Asn Tyr Thr Ile Lys Ile Ala Asp Phe Gly Met Ser Arg Asn Leu Tyr
        725          730          735
Ser Gly Asp Tyr Tyr Arg Ile Gln Gly Arg Ala Val Leu Pro Ile Arg
        740          745          750
Trp Met Ser Trp Glu Ser Ile Leu Leu Gly Lys Phe Thr Thr Ala Ser
        755          760          765
Asp Val Trp Ala Phe Gly Val Thr Leu Trp Glu Thr Phe Thr Phe Cys
        770          775          780
Gln Glu Gln Pro Tyr Ser Gln Leu Ser Asp Glu Gln Val Ile Glu Asn
        785          790          795          800
Thr Gly Glu Phe Phe Arg Asp Gln Gly Arg Gln Thr Tyr Leu Pro Gln
        805          810          815
Pro Ala Ile Cys Pro Asp Ser Val Tyr Lys Leu Met Leu Ser Cys Trp
        820          825          830
Arg Arg Asp Thr Lys Asn Arg Pro Ser Phe Gln Glu Ile His Leu Leu
        835          840          845
Leu Leu Gln Gln Gly Asp Glu
        850          855
<210>      2
<211>      22
<212>      PRT
<213>      Artificial Sequence
<220>
<223>      transmembrane domain of human DDR2 protein (400-420)
<400>      2
Ile Leu Ile Gly Cys Leu Val Ala Ile Ile Phe Ile Leu Leu Ala Ile
1          5          10          15
Ile Val Ile Ile Leu Trp
        20
<210>      3
<211>      415
<212>      PRT
<213>      Artificial Sequence
<220>
<223>      C-terminal tyrosine kinase active domain of human DDR2 protein
        (441-855)
<400>      3
Met Thr Val Ser Leu Ser Leu Pro Ser Asp Ser Ser Met Phe Asn Asn
1          5          10          15
Asn Arg Ser Ser Ser Pro Ser Glu Gln Gly Ser Asn Ser Thr Tyr Asp
        20          25          30
Arg Ile Phe Pro Leu Arg Pro Asp Tyr Gln Glu Pro Ser Arg Leu Ile
        35          40          45
Arg Lys Leu Pro Glu Phe Ala Pro Gly Glu Glu Glu Ser Gly Cys Ser
        50          55          60
Gly Val Val Lys Pro Val Gln Pro Ser Gly Pro Glu Gly Val Pro His
        65          70          75          80

```

Tyr Ala Glu Ala Asp Ile Val Asn Leu Gln Gly Val Thr Gly Gly Asn
 85 90 95
 Thr Tyr Ser Val Pro Ala Val Thr Met Asp Leu Leu Ser Gly Lys Asp
 100 105 110
 Val Ala Val Glu Glu Phe Pro Arg Lys Leu Leu Thr Phe Lys Glu Lys
 115 120 125
 Leu Gly Glu Gly Gln Phe Gly Glu Val His Leu Cys Glu Val Glu Gly
 130 135 140
 Met Glu Lys Phe Lys Asp Lys Asp Phe Ala Leu Asp Val Ser Ala Asn
 145 150 155 160
 Gln Pro Val Leu Val Ala Val Lys Met Leu Arg Ala Asp Ala Asn Lys
 165 170 175
 Asn Ala Arg Asn Asp Phe Leu Lys Glu Ile Lys Ile Met Ser Arg Leu
 180 185 190
 Lys Asp Pro Asn Ile Ile His Leu Leu Ser Val Cys Ile Thr Asp Asp
 195 200 205
 Pro Leu Cys Met Ile Thr Glu Tyr Met Glu Asn Gly Asp Leu Asn Gln
 210 215 220
 Phe Leu Ser Arg His Glu Pro Pro Asn Ser Ser Ser Ser Asp Val Arg
 225 230 235 240
 Thr Val Ser Tyr Thr Asn Leu Lys Phe Met Ala Thr Gln Ile Ala Ser
 245 250 255
 Gly Met Lys Tyr Leu Ser Ser Leu Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala
 260 265 270
 Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Lys Asn Tyr Thr Ile Lys Ile Ala Asp
 275 280 285
 Phe Gly Met Ser Arg Asn Leu Tyr Ser Gly Asp Tyr Tyr Arg Ile Gln
 290 295 300
 Gly Arg Ala Val Leu Pro Ile Arg Trp Met Ser Trp Glu Ser Ile Leu
 305 310 315 320
 Leu Gly Lys Phe Thr Thr Ala Ser Asp Val Trp Ala Phe Gly Val Thr
 325 330 335
 Leu Trp Glu Thr Phe Thr Phe Cys Gln Glu Gln Pro Tyr Ser Gln Leu
 340 345 350
 Ser Asp Glu Gln Val Ile Glu Asn Thr Gly Glu Phe Phe Arg Asp Gln
 355 360 365
 Gly Arg Gln Thr Tyr Leu Pro Gln Pro Ala Ile Cys Pro Asp Ser Val
 370 375 380
 Tyr Lys Leu Met Leu Ser Cys Trp Arg Arg Asp Thr Lys Asn Arg Pro
 385 390 395 400
 Ser Phe Gln Glu Ile His Leu Leu Leu Leu Gln Gln Gly Asp Glu
 405 410 415
 <210> 4
 <211> 1608
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> full-length src c-DNA
 <400> 4
 atgggcagca acaagagcaa gcccaaggac gccagccagc ggcgccgcag cctggagccc
 tcgaaaaacg tgcacggggc agggggcgcc ttcccgccct cacagacacc gagcaagccc
 gcctccgcgc agcgccaccg cgggcccagc gcgcctctcg tggcggccgc gcccgagccc
 aagctctctcg gaggccttcaa ctctcggac acgctcaact cccgcagag ggcggggcct
 ctggcaggtg ggggtgaccac ctttgtggcc ctctatgact atgagtcaac gacagagact
 gacctgtcct tcaagaaagg ggagcggctg cagattgtta acaacacgga gggagactgg
 tggctggcac actcgtctgag caggggacag accggttaca tcccagcaa ctatgtggcg
 ccctccgact ccatccagcg tgaggaagtgg tactttgtta agatcaactag acgagaatca
 gagcgcgctgc tgcaccaacg cgagaaccg agagggaact tctcgtgag ggagagtgg

60
 120
 180
 240
 300
 360
 420
 480
 540

```

accacaaaag gtgcctactg cctctctgta tccgacttcg acaatgcca ggggtctaaat      600
gtgaacacact acaagatccg caagctggac agcggcggtt tctacatcac ctcccgacc      660
caglttcaaca gcctgcagca gctcgtggct tactactcca aacatgctga tggcctgtgt      720
cacccgctca ctaccgtatg tcccacatcc aagctccaga cccagggatt ggcacaaggat      780
gcgtgggaga tcccccgga gtcctcgcg ctggagggtca agctgggcca gggttgcttc      840
ggagagggtgt ggaatggggac ctggaaacgac accacgaggg ttgccatcaa aactctgaag      900
ccaggcacca tgtccccaga ggcttctctg caggaggccc aagtcatgaa gaaactgagg      960
cacgagaac tgggtcgact gtatgctgtg gtgtcggaag aaccatttta catgtgaca      1020
gagtacatga acaaggggag tctgctggac ttctcaagg gggaaacggg caaattattg      1080
cggtaccacc agctgggtga catgtctgct cagatcgctt caggcatggc ctatgtggag      1140
cggatgaact atgtgcaccg ggaccttoga gcgcgaata tctagtagg ggagaacctg      1200
gtgtgcaaa gtcgcgactt tgggttggcc cggctcatag aagacaacga atacacagcc      1260
cggcaagggt ccaattccc catcaagtgg accgccccg aagctgctct gtacggcagg      1320
ttaccatca agtcggaagt gtggtccttt gggattctgc tgaccgagct caccactaag      1380
ggagaggtgc cctatctctg gatgtgaac cgtgaggttc tggaccaggt ggagcggggc      1440
taccggatgc ctgttcccc cgaagtcccc gagtccctgc atgaccttat gtgccagtg      1500
ttcgggaagg agcccgagga gcggccccc ttcgagtacc tgcaggcctt cctggaagac      1560
tactttactg ccactgagcc acagtaccag ccgggggaga acctatag      1608
<210>      5
<211>      29
<212>      DNA
<213>      Artificial Sequence
<220>
<223>      5' primer for PCR of DDR2 protein
<400>      5
cccgatcca tgacagtcag cctttccct
<210>      6
<211>      30
<212>      DNA
<213>      Artificial Sequence
<220>
<223>      3' primer for PCR of DDR2 protein
<400>      6
gggtctagat cactcgtcgc ctgttgaaag
<210>      7
<211>      30
<212>      DNA
<213>      Artificial Sequence
<220>
<223>      5' primer for PCR of human full-length src c-DNA
<400>      7
ggggattcg acggatcggg agatctcccc
<210>      8
<211>      33
<212>      DNA
<213>      Artificial Sequence
<220>
<223>      3' primer for PCR of human full-length src c-DNA
<400>      8
cccgattcg acgtcaggtg gcacttttcg ggg

```

33